

DEUTSCH / 00747

BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND



REC'D	01 JUL 2003
WIPO	PCT

Prioritätsbescheinigung über die Einreichung einer Patentanmeldung

Aktenzeichen: 102 08 364.9

Anmeldetag: 24. August 2002

Anmelder/Inhaber: Dr. Gerold Lukowski, Greifswald/DE;
Dr. Wolf-Dieter Jülich, Greifswald/DE;
Prof. Dr. Ulrike Lindquist, Greifswald/DE.

Bezeichnung: Mittel zur Hautpflege mit schützender Wirkung
vor Besiedelung mit Keimen, die eine nosoko-
miale Infektion hervorrufen können

IPC: A 61 K 7/48

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprüng-
lichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

München, den 18. Juni 2003
Deutsches Patent- und Markenamt
Der Präsident
Im Auftrag

PRIORITY DOCUMENT
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH
RULE 17.1(a) OR (b)

Dr. J. Zorn

BEST AVAILABLE COPY

Mittel zur Hautpflege mit schützender Wirkung vor Besiedlung mit Keimen, die eine nosokomiale Infektion hervorrufen können



Zusammenfassung

Zur Prophylaxe nosokomialer Infektionen wurde eine synergistische Kombination gefunden, bei deren Anwendung die Adhäsion und die Vermehrung von Anflugkeimen auf der Haut unterdrückt wird.

Stand der Technik

Staphylococcus aureus ist ein häufiger Kommensale. Etwa 30% der Bevölkerung sind dauerhaft symptomfrei mit *S. aureus* besiedelt. Die häufige symptomfreie Besiedlung führt zu einer oft unbemerkteten Weiterverbreitung.

Andererseits ist *S. aureus* auch ein häufiger Erreger schwerer Infektionen und von Sepsis, vor allem bei abwehrgeschwächten Patienten.

Besorgniserregend ist die rasche Entwicklung multiresistenter *S. aureus* Stämme (MRSA). Auf Grund der Multiresistenz sind Infektionen mit MRSA therapeutisch schwer beherrschbar. Die Verbreitung der MRSA-Stämme ist bisher jedoch weitgehend auf die Krankenhäuser beschränkt. Deshalb besteht unabhängig von der Ersterkrankung bei Aufnahme in ein Krankenhaus eine große Gefahr. Etwa 10 % der aufgenommenen Patienten erkranken an nosokomialen Infektionen. Es wird mit 600 000 bis 800 000 Infektionen mit multiresistenten Erregern gerechnet, die im Krankenhaus erworben werden (Hyg. Med. 26 (2001)183). Staphylokokken sind die wichtigsten Erreger, bei denen mit einem völligen Versagen der antibiotischen Therapie gerechnet wird. Eine Hautpflege, die der Besiedlung mit multiresistenten Keinern entgegenwirkt, kann bei der Aufnahme in ein Krankenhaus die Gefahr einer nosokomialen Infektion vermindern. Wenn nur ein Teil dieser Infektionen verhindern werden kann, wäre dies ein großer Erfolg.

Zur Dekolonisation beim Auftreten von MRSA werden bisher bakterizid wirkende Substanzen eingesetzt. Dadurch wird auch die Standortflora abgetötet. Damit wird bei einer Neubesiedlung der Haut die Ansiedlung von MRSA sogar erleichtert.

Kürzlich wurde bekannt, dass antimicrobielle Peptide die Haut vor einer invasiven bakteriellen Infektion schützen. (V.Nizet, T. Ohtake, X. Lauth, J. Trowbridge, J. Rusdill, R.A. Dorschner, V. Pestonjamasp, J. Piraino, K. Huttner, R.L. Gallo: Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. Nature 414, 454-457 (2001). Diese Peptide werden auf der Oberfläche von Epithelzellen und in Neutrophilen gebildet und bewirken eine sehr frühe Abwehr eingedrungener Erreger. Sie bewirken zelluläre Effekte, die sich deutlich von der antibakteriellen Aktivität *in vitro* unterscheiden. Der kritische erste Schritt einer Kausalkette, die letztendlich zu einer Infektion führt, ist die Bindung von Adhäsinen des Erregers an geeignete Rezeptoren auf der Hautoberfläche. Die Adhäsion wird in vielen Fällen eingeleitet durch Bindung von auf der Oberfläche des Erregers ausgebildeten Proteinen an Kohlenhydrat-Rezeptoren des Wirts, daneben spielen auch Protein-Protein-Wechselwirkungen und Bindung von Polysacchariden des Erregers an Rezeptoren auf der Haut eine Rolle (Relman D, Tuomanen E, Falkow S et al., Cell 1990; 61: 1375-1382; Kanbe T., Cutler JE. Infect Immun 1994; 62: 1662-1668).

Verfahren, die eine Nutzung der Vielfalt der Lipide aus marinen Organismen ermöglichen, werden in der zeitgleich hinterlegten Schutzrechtsanmeldung (Lukowski et al.:

Wirkstoffbeladene Mikro- und Nanopartikel aus lipidhaltigen marinen Organismen, deren Herstellung und Verwendung) beschrieben. Diese Verfahren eröffnen neue Möglichkeiten auch für die Prophylaxe nosokomialer Infektionen.

Die Aufgabe, die durch die Erfindung gelöst werden soll, ist die Entwicklung hochwertiger Pflegestoffe für die Haut, die die Besiedlung mit pathogenen Keimen schon in ihrem Anfangsstadium vermindern, und insbesondere MRSA bei der Adhäsion und bei der Kolonisation hemmen.

Die Aufgabe wird erfundungsgemäß durch eine synergistisch wirkende Kombination von Lipiden, Immunstimulatien, Radikalfängern und Xanthonen der allgemeinen Formel 1 gelöst, durch die Effekte erzielt werden, die auf bekannten Wegen nicht erreicht werden können.

Es war bereits überraschend, dass das nicht bakterizid wirkende natürliche Wirkstoffe wie in der Natur weit verbreitete Ubichinonderivate, hydroxylierte Aromaten, wie sie in verschiedenen Pilzarten gefunden werden, und Inhaltsstoffe von marinen Organismen wie Norlichhexanthon in vitro das Wachstum von MRSA hemmen. Ein Einsatz dieser an sich bekannten Stoffe zur Bekämpfung von MRSA wurde bisher nicht beschrieben. Als Einzelstoffe können diese Naturstoffe auf der Haut Staphylokokken jedoch nicht in ausreichendem Maße abtöten.

Bei Übertragungsversuchen von mit MRSA kontaminiertem Haut (Donator) auf keimarme Haut (Akzeptor) hat sich überraschenderweise gezeigt, dass eine Übertragung von MRSA weitgehend vermieden werden kann, wenn die Haut vor der Übertragung mit einer synergistisch wirkenden Kombination von Lipiden, Immunstimulatien, Radikalfängern und Xanthonen der allgemeinen Formel gepflegt wurde. Offensichtlich werden durch diese synergistische Kombination bereits sehr frühe Stufen der Kausalkette von der Übertragung der pathogenen Mikroorganismen bis zur Infektion gestört, so dass bereits die Ausbildung einer Kolonisation verhindert werden kann.

Vorteilhaft ist ein Einsatz der Lipidkomponenten als Mikro- und Nanopartikel mit einem mittleren Durchmesser von 10 nm – 10 µm. Als Lipidkomponenten können mehrfach ungesättigte C16-C22-Fettsäuren insbesondere Linolsäure (C18:2), und/oder Linolensäure (C18:3) und/oder Arachidonsäure (C20:4) und/oder, Eicosapentaensäure (EPA, C20:5) und/oder Docosahexaensäure und/oder Hydroxyfettsäuren vorteilhafterweise Coriolsäure (13-HODE Z,E) und α-Dimorphécolsäure enthalten sein. Besonders vorteilhaft ist die Verwendung von Mikro- und/oder Nanopartikeln aus lipidhaltigen marinen Organismen als natürlichen Produkten, welche ungesättigte Fettsäuren in für die Hautpflege optimalen Relationen und in Kombination mit Vitaminen, Proteinen und Mineralstoffen enthalten. Die

Verfahren zur Herstellung dieser Mikro- und Nanopartikel werden in einer zeitgleich hinterlegten Schutzrechtsanmeldung (Lukowski et al.: Wirkstoffbeladene Mikro- und Nanopartikel aus lipidhaltigen marinen Organismen, deren Herstellung und Verwendung) beschrieben. Lipide aus natürlichen Organismen enthalten zahlreiche Stoffe, die eine Immunstimulation bewirken. Es ist daher vorteilhaft, in dem erfindungsgemäßen Mittel zur Hautpflege, Lipidderivate aus natürlichen Quellen als Immunstimulatien einzusetzen. Besonders günstig ist der Einsatz von Derivaten des Müringerüstes, Lipopolysachariden, Lipoproteinen, Lipopeptiden. Der Einsatz von synthetische Lipidanaloga und Lipopeptide ist ebenfalls möglich und besonders dann aussichtsreich, wenn über die kosmetische Anwendung hinausgehend an eine arzneiliche Verwendung gedacht wird. Als Immunstimulans können auch anorganische Thiocyanate und Hydrothiocyanate organischer Basen eingesetzt werden. Die Thiocyanate wirken gleichzeitig als Radikalfänger.

Als Radikalfänger werden vorteilhaft hydroxylierte Aromaten, die in der Lage sind chinoiden Strukturen auszubilden, eingesetzt.

Vorteilhafterweise können Ubichinone der allgemeinen Formel 2 mit der Kettenlänge $n=1$ bis $n=15$ verwendet werden. Als eine besonders vorteilhafte Lösung hat sich dabei herausgestellt, Lipide und Ubichinonone durch Hochdruckhomogenisation fein zu verteilen und in Kombination mit Xanthonen der allgemeinen Formel 1 einzusetzen.

Es ist möglich, die in der synergistischen Kombination eingesetzten Mikro- und Nanopartikel mit antimikrobiellen Wirkstoffen vorzugsweise mit lokal anwendbaren Antibiotika zu dotieren. Überraschenderweise bewirken Xanthone, die als Einzelstoff auf der Haut keine ausreichende Wirksamkeit zeigen, in der synergistischen Kombination nicht nur eine Verhinderung der Adhäsion sondern auch eine Rückbildung einer bereits eingetretenen Kolonisation. Dieser überraschende Effekt bildet die Grundlage für verschiedene Anwendungen in der Medizin und in der Kosmetik. Dabei kann die synergistische Kombination in kosmetischen Produkten allein oder in Kombination mit anderen Pflegeprodukten eingesetzt werden. Ein Haupteinsatzgebiet ist die Verwendung zur Verbesserung der natürlichen Barrierefunktion der Haut und/oder zur Verhinderung der Adhäsion pathogener Bakterien und/oder zur Veränderungen des Hautmilieus, durch welche nosokomial bedeutsame Anflugkeime in ihrer Bindung an Rezeptoren auf der Haut oder auf Geweben und/oder in ihrem Wachstum behindert werden. Dadurch ergeben sich bisher nicht erkannte Möglichkeiten zur Prophylaxe nosokomialer Infektionen.

Diese besonderen Eigenschaften mit antimikrobiellen Wirkstoffen dotierter Mikro- und Nanopartikel ermöglichen die Verwendung des Hautpflegemittels in der Medizin und insbesondere den Einsatz zur Dekolonisation der Haut und den Einsatz in Wundabdeckungen. Der Pflegekomplex kann in Form von Ölen, Sprays und/Salben eingesetzt werden. Eine in manchen Fällen vorteilhafte Anwendungsform ist Verwendung des Pflegekomplexes zur Imprägnierung von textilen und/oder auf Zellulosebasis hergestellten Materialien, die zur Hautpflege oder zur Dekontamination von Schleimhäuten vorgesehen sind.

Das Verfahren soll nachfolgend an einigen Beispielen erläutert werden, ohne sich auf diese zu beschränken.

Beispiel 1

Ermittlung der antibakteriellen Wirksamkeit im Agardiffusionshemmtest.

Erreger	Trihydroxybenzaldehyd	Trihydroxybenzaldehyd 3 %ig in dickflüssigen Paraffin	Trihydroxybenzaldehyd 10 %ig in dickflüssigen Paraffin	
Norddeutscher Stamm		12 mm	14 mm	

Beispiel 2

Verhinderung der Übertragung von MRSA bei Hautkontakte

Methodik

Für die Versuche wurden Schwänze von Mäusen aus keimfreier Haltung verwendet. Um jede Fremdkontamination auszuschließen, wurde sie vor Versuchsbeginn für 5 min in 70 %igen Alkohol eingelegt und danach unter der Laminarbox getrocknet.

Die Donatormäuseschwänze wurden durch Einlegen (30 s bis 4 min) in eine verdünnte MRSA-Kultur (Norddeutscher Stamm, MF-Standard 0,5 bzw. 0,3) kontaminiert und danach 24 h bei 37 °C bebrütet. Bei Abstrichen von diesen Donatoren wurden Keimzahlen > 100.000 nachgewiesen.

In die Akzeptorschwänze wurden die Versuchssubstanzen zweimal täglich einmassiert.

Die Kontamination der Akzeptoren erfolgte durch Hautkontakt mit den Donatoren für 30 s bis 1 min auf der Schüttelmaschine bei 600 U/min. 2 h bzw. 24 h nach der Kontamination wurden die Donatoren auf Blut-Müller-Hinton-Agarplatten ausgestochen. Nach 24 h Bebrütung der Agarplatten bei 37 °C wurden die Kolonien ausgezählt.

Ergebnisse:

Beim Ausstreichen der Akzeptoren unmittelbar nach dem Hautkontakt sind die Platten vollständig bewachsen (Keimzahl > 10 000). Das gilt gleicherweise für vorbehandelte wie für Kontrollen ohne Vorbehandlung, d.h. die Akzeptoren kontaminiert. 2 h bzw. 24 h sind dagegen nur noch geringen Keimzahlen bei den vorbehandelten Akzeptoren nachzuweisen, während die Keimzahlen bei den unbehandelten Kontrollen unverändert hoch sind. (Tab. 1)

Tab. 1

Keimzahlen auf Mäuseschwänzen (Akzeptoren) in Abhängigkeit von der Vorbehandlung nach Kontakt mit mit MRSA kolonisierten Mäuseschwänzen (Donatoren).

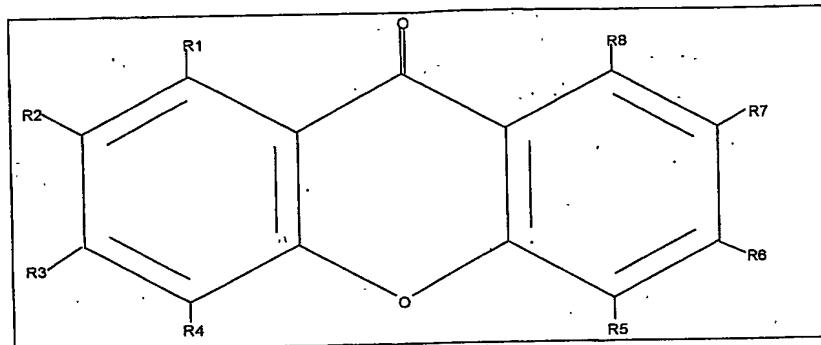
Donator		Hautkontakt (min)	Vorbehandlung des Akzeptors	Keimzahl des Akzeptors	
McFarland-Standard	Kontamination (min)			2 h	24 h

13

0,5	5	0,5 1	ohne	>10000 > 10000	>10000 > 10000
0,5	5	0,5 1	2 d Gemisch	143 80	2 36
0,5	3	0,5 1	ohne	>10000	>10000
			2 d Gemisch		6
0,3	1	1	ohne		> 10000
					2

Ansprüche

1. Mittel zur Hautpflege, gekennzeichnet durch eine Kombination von Lipiden und/oder Immunstimulanten und/oder Radikalfängern und/oder Xanthonderivaten der allgemeinen Formel 1, mit den in Tab. 1 aufgeführten Substituenten in beliebiger Anzahl (0-4 je Phenylring) und in beliebiger Kombination.



Formel 1

Reste R1, R2, R3, R4, R5, R6, R7, R8, wobei R1-R8 in Tab. 1 aufgeführte Substituenten sein können.

H, OH, OMe, OAc
Me, Ac, CH ₂ OH, CHO, CF ₃ , COOH, COOMe; CN, CONH ₂
Cl, F, NO ₂ , NH ₂ , NHAc, NMe ₂

Tabelle 1

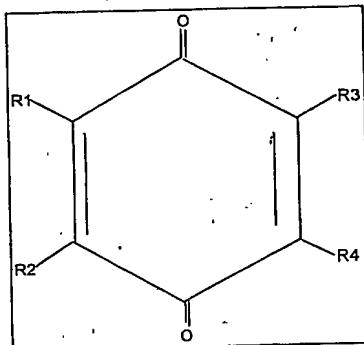
2. Mittel zur Hautpflege nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass die Lipidkomponenten als Mikro- und Nanopartikel mit einem mittleren Durchmesser von 10 nm – 10 µm vorliegen
3. Mittel zur Hautpflege nach Beispiel 1 und 2, dadurch gekennzeichnet, dass als Lipidkomponenten mehrfach ungesättigte C16-C22-Fettsäuren insbesondere Linolsäure (C18:2), und/oder Linolensäure (C18:3) und/oder Arachidonsäure (C20:4) und/oder, Eicosapentaensäure (EPA, C20:5) und/oder Docosahexaensäure und/oder Hydroxyfettsäuren vorteilhafterweise Coriolsäure (13-HODE Z,E) und α -Dimorphecolsäure enthalten sind.
4. Mittel zur Hautpflege nach Anspruch 1-3, dadurch gekennzeichnet, das Lipide aus natürlichen Quellen in Kombination mit Vitaminen, Proteinen, und Mineralstoffen enthalten sind

5. Mittel zur Hautpflege nach Anspruch 1-3, dadurch gekennzeichnet, dass Derivate des Muringerüstes und/oder Lipopolysacharide und/oder Lipoproteine und/oder Lipopeptide und/oder synthetische Lipidanaloga und/oder Lipopeptide enthalten sind.

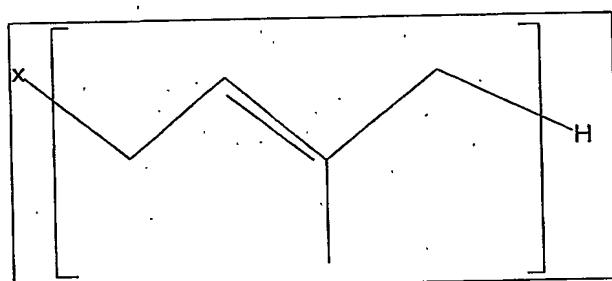
6. Mittel zur Hautpflege nach Anspruch 1-5, dadurch gekennzeichnet dass sie anorganische Thiocyanate und/oder Hydrothiocyanate organischer Basen enthalten.

7. Mittel zur Hautpflege nach Anspruch 1-6, dadurch gekennzeichnet, dass sie Verbindungen enthalten, die in der Lage sind, chinoiden Strukturen auszubilden

8. Mittel zur Hautpflege nach Anspruch 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass als Radikalfänger Tocepherole und /oder Benzochinone der allgemeinen Formel 2 mit der Kettenlänge $n = 1$ bis $n = 15$ enthalten sind, mit den Resten R1-R3, wobei R1, R2 und R3 Wasserstoff, Halogen, Alkyl- oder Alkoxygruppe vorliegen, R4 als isoprenoide Seitenkette mit 1 bis 10 isoprenoiden Einheiten X oder als aliphatische Seitenkette mit 1 bis 10 CH₃-Gruppen vorliegen kann.

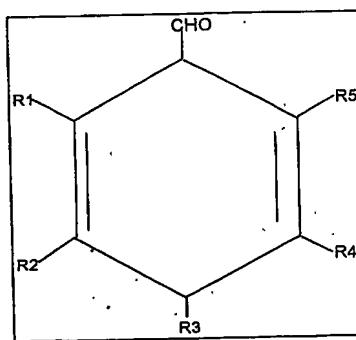


Formel 2



Formel 3

9. Mittel zur Hautpflege nach Anspruch 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass Derivate des Dihydroxybenzaldehyd mit der allgemeinen Formel 4 enthalten sind mit den Resten, wobei R1, R2, R3, R4 und R5 als Wasserstoff, Halogen, Alkyl –oder Alkangruppe vorliegen.



Formel 4

10. Mittel zur Hautpflege nach Anspruch 1 bis 9, dass die enthaltenen Mikro- und Nanopartikel mit antimikrobiellen Wirkstoffen vorzugsweise mit lokal anwendbaren Antibiotika dotiert sind

11. Verwendung des Mittels zur Hautpflege nach Anspruch 1-10 als Kosmetikum und in der Medizin

12. Verwendung des Mittels zur Hautpflege nach Anspruch 1-10 in kosmetischen Produkten allein oder in Kombination mit anderen Pflegeprodukten
13. Verwendung des Mittel zur Hautpflege nach Anspruch 1-10 zur Prophylaxe nosokomialer Infektionen.
14. Verwendung des Mittel zur Hautpflege nach Anspruch 1-10 zur Verbesserung der natürlichen Barrierefunktion der Haut und/oder zur Verhinderung der Adhäsion pathogener Bakterien und/oder zur Veränderungen des Hautmilieus, durch welche nosokomial bedeutsame Anflugkeime in ihrer Bindung an Rezeptoren auf der Haut oder auf Geweben und/oder in ihrem Wachstum behindert werden.
15. Verwendung des Mittels zur Hautpflege nach Anspruch 10 zur Dekolonisation
16. Verwendung des Mittel zur Hautpflege nach Anspruch 10 zur dosierten Freisetzung antimikrobiellen Wirkstoffe und gleichzeitiger Immunstimulation
17. Verwendung des Mittel zur Hautpflege in Form von Ölen, Sprays und/Salben und zur Imprägnierung von textilen und/oder auf Zellulosebasis hergestellten Materialien.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.